

Bericht zur Max-Buchner-Forschungsarbeit

„Zellfreie Synthese von Enzymen zur Produktion von pharmazeutisch relevanten Molekülen“ (MBFSt-Kennziffer: 3748)

Katrin Rosenthal, TU Dortmund

1. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Natur liefert ein breites Repertoire an unterschiedlichen Enzymen, die stetig neue Reaktionen und damit neue Produkte zugänglich machen¹. Viele Enzyme katalysieren sehr spezifisch chemische Reaktionen, manche Enzyme akzeptieren dennoch strukturell unterschiedliche Substrate, zeichnen sich also durch Substrat-Promiskuität aus^{2, 3}. Substrat-Promiskuität bedeutet für biologische Systeme einen evolutionären Vorteil und gleichzeitig eine breite Anwendbarkeit als Biokatalysator⁴.

Ziel dieses Projektes ist homologe Enzyme zu synthetisieren und auf ihr Substratspektrum zu untersuchen. Als Enzyme werden zyklische GMP-AMP Synthasen (cGAS) verwendet, die die Zyklisierung von ATP und GTP zu zyklischem GMP-AMP (2'3'-cGAMP) katalysieren. Das 2'3'-cGAMP ist ein sekundärer Botenstoff der in Säugerzellen eine Signalkaskade zur Produktion von Interferonen und Cytokinen aktiviert, um mikrobiellen, parasitären und viralen Infektionen entgegenzusteuern^{5, 6}. In bisherigen Studien wurden die katalytische Aktivität und der Reaktionsmechanismus des humanen und murinen cGAS charakterisiert⁷⁻⁹. Es ist nicht bekannt, ob cGAS auch nicht-natürliche Substrate, also ATP- bzw. GTP-Derivate, akzeptiert und zyklisiert. Die Relevanz von solchen Produktderivaten zeigen aktuelle Studien, in denen nachgewiesen wurde, dass chemisch synthetisiertes 2'3'-cGAMP und einzelne Derivate in der Tumorthherapie eingesetzt werden können¹⁰. Die chemische Synthese ist jedoch sehr aufwändig und resultiert in geringen Ausbeuten. Dies bestärkt das Interesse und den Bedarf, zyklische Dinukleotide enzymatisch herzustellen und neue Derivate zu synthetisieren, die gegebenenfalls neue Eigenschaften aufweisen.

2. Durchgeführter Arbeitsplan

Es wurde zunächst die Synthese von 8 verschiedenen homologen cGAS-Varianten mittels zellfreier Proteinsynthese validiert. Aufgrund der geringen Enzymkonzentrationen, welche durch die Synthese erhalten wurden, wurden die Enzyme im Anschluss *in vivo* synthetisiert, um die katalytische Aktivität nachzuweisen. Für eines der Enzyme wurde das Substratspektrum analysiert, indem 16 kommerziell erhältliche Substrat-Derivate eingesetzt wurden. Die Substrate haben Modifikationen an der Ribose-, Base- bzw. an dem alpha-Phosphat-Rest. Die erhaltenen Produkte wurden mittels HPLC und LC-MS nachgewiesen und die Abnahme der Substrate quantifiziert. Zusätzlich wurde eine präparative Menge von zwei Derivaten syn-

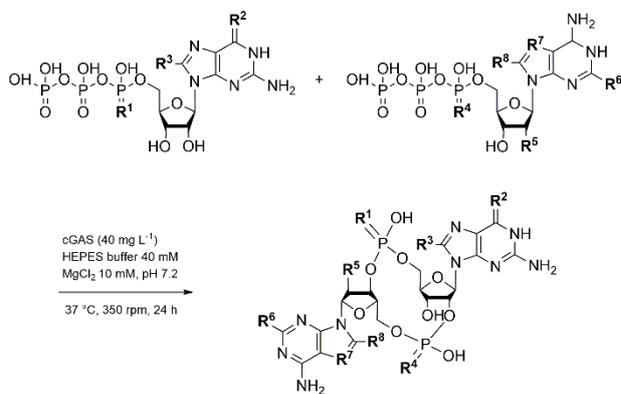
thetisiert, aufgereinigt und mittels NMR bestätigt.

3. Ergebnisse

Zunächst wurde die Expression von verschiedenen homologen cGAS-Homologen mit zellfreier Proteinsynthese validiert¹¹. Die Aminosäuresequenzen der homologen Enzyme, die ein breites Spektrum im Bereich der Wirbeltiere abdecken, haben Übereinstimmungen von 20 % bis 90 %. Die zellfreie Proteinsynthese wurde für das Screening eingesetzt, um zu untersuchen, ob die aus höheren Organismen stammenden cGAS-Gene effizient in einem *E. coli*-basierenden Expressionssystem synthetisiert werden können. Es konnten zwar alle Homologe synthetisiert werden, aber nicht in ausreichenden Mengen, um einen Aktivitätsassay zum Nachweis der katalytischen Aktivität zur cGAMP-Synthese durchzuführen. Deswegen wurden die Enzyme *in vivo* synthetisiert, um größere Mengen bereit stellen zu können. Damit wurde erfolgreich nachgewiesen, dass die neuen cGAS-Homologe vom Przewalski-Pferd, Nacktmull, Weißkopfsaadler und Zebrafisch die Synthese von cGAMP katalysieren. Die Erweiterung der Liste der beschriebenen cGAS-Varianten ermöglicht den Erwerb weiterer Kenntnisse über den strukturellen und molekularen Mechanismus von cGAS, was möglicherweise zu einer funktionellen Verbesserung des Enzyms führt.

Eins der Homologe, das humane cGAS, wurde anschließend auf das Substrat-Spektrum, welches zu cGAMP-Derivaten führt, untersucht¹². 2'3'-cGAMP fungiert als Induktor für die Produktion von Typ-I-Interferonen. Derivate dieses wichtigen Botenstoffs sind für pharmazeutische Anwendungen sehr wertvoll. Es konnte gezeigt werden, dass humanes cGAS mit einer

Reihe von Nukleotiden-Derivaten reagiert und so zu neuartigen zyklischen Dinukleotiden führt. Die meisten der ausgewählten Substratderivate mit Modifikationen an der Nukleobase, Ribose und dem α -Thiophosphat wurden akzeptiert. Die katalytische Promiskuität und die anschließende erfolgreiche Anwendung in der präparativen Maßstabssynthese demonstrieren das biokatalytische Potential von cGAS für die zyklische Dinukleotidsynthese.



R¹ = O, S; R² = O, S, H; R³ = H, Br; R⁴ = O, S; R⁵ = OH, F, NH₂, H;
R⁶ = H, Cl, SMe, NH₂; R⁷ = N, C; R⁸ = H, Br, Cl, NH₂, N₃

Abbildung 1: cGAS-katalysierte Umwandlung von Substratderivaten in zyklische Dinukleotid-Derivate.

4. Fazit

Mit diesem Projekt wurde die Grundlage für ein vielseitig einsetzbares Enzymscreening entwickelt. Durch die Anwendung von zellfreier Proteinsynthese ist innerhalb kürzester Zeit die Synthese von Enzymen für Expressionsstudien oder Aktivitätsüberprüfung möglich. Weiterhin konnte ein Enzym umfangreich charakterisiert und eingesetzt werden, um neue Produkte zu synthetisieren, welche für die aktuelle Forschung eine große Relevanz besitzen und für die ein enormes gesellschaftliches Interesse besteht.

5. Veröffentlichungen, die im Rahmen dieses Projektes entstanden sind

Publikationen

Rosenthal K., Becker M., Rolf J., Siedentop R., Hillen M., Nett M., Lütz S.
Catalytic promiscuity of cGAS: A facile enzymatic synthesis of 2'-3' linked cyclic dinucleotides
ChemBioChem 2020, 21, 1-5

Rolf J., Siedentop R., Lütz S., Rosenthal K.
Screening and Identification of Novel cGAS Homologues Using a Combination of *In Vitro* and *In Vivo* Protein Synthesis
International Journal of Molecular Science 2020, 21(1):105

Vorträge

Rosenthal K.
Microbioreactors for Biotransformations and Whole Cell Biocatalysis
µTAS 2020 (24th International Conference on miniaturized Systems for Chemistry and Life Science), 3. - 4. Oktober 2020, online

Rosenthal K., Rolf J., Lütz S.
Cell-free protein synthesis: Accelerating biocatalyst development
German Conference on Synthetic Biology, 12. - 13. September 2019, Aachen, Germany

Poster

Rosenthal K., Rolf J., Becker M., Siedentop R., Lütz S.
Cell-free synthesis of enzymes for the production of pharmaceutically relevant molecules
ProcessNet-Jahrestagung, 21. - 24. September 2020, online

6. Literatur

1. Rosenthal, K. & Lütz, S. *Curr Opin Green Sust Chem* **11**, 58-64 (2018).
2. Gupta, R.D. *Sustain Chem Process* **4**, 2 (2016).
3. Pandya, C. et al. *J Biol Chem* **289**, 30229-30236 (2014).
4. Khersonsky, O. & Tawfik, D.S. *Annu Rev Biochem* **79**, 471-505 (2010).
5. Watson, R.O. et al. *Cell Host Microbe* **17**, 811-819 (2015).
6. Herzner, A.M. et al. *Nat Immunol* **16**, 1025-1033 (2015).
7. Ablasser, A. et al. *Nature* **498**, 380-384 (2013).
8. Hall, J. et al. *Protein Sci* **26**, 2367-2380 (2017).
9. Kranzusch, P.J. & Vance, R.E. *Immunity* **39**, 992-994 (2013).
10. Corrales, L. et al. *Cell Rep* **11**, 1018-1030 (2015).
11. Rolf, J. et al. *Int J Mol Sci* **21**, 105 (2020).
12. Rosenthal, K. et al. *ChemBioChem* **21**, 1-5 (2020).